

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. Mai 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/039444 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/12438
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
7. November 2002 (07.11.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
101 54 579.7 7. November 2001 (07.11.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **MEDIGENE AKTIENGESellschaft** [DE/DE]; Lochhamer Str. 11, 82152 Planegg/Martinsried (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **NIELAND, John** [NL/DE]; Tellhöhe 18, 82131 Stockdorf (DE). **REHFUESS, Christoph** [DE/DE]; Wilramstr. 25, 81669 München (DE).
- (74) Anwalt: **BÖSL, Raphael**; Isenbruck Bösl Hörschler Wichmann Huhn, Prinzregentenstr. 68, 81675 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**A66 - 10/807,997**

**WO 03/039444 A2**

(54) Title: TOPICAL USE OF CYTOKINES AND CHEMOKINES FOR THE TREATMENT OF VIRAL OR MYCOTIC SKIN DISEASES OR TUMORAL DISEASES

(54) Bezeichnung: TOPIKALE VERWENDUNG VON CYTOKINEN UND CHEMOKINEN ZUR BEHANDLUNG VON VIRALEN ODER MYKOTISCHEN HAUTERKRANKUNGEN ODER TUMORERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of at least one cytokine and/or chemokine in the production of a topically acting medicament for treating viral and/or mycotic skin diseases and/or tumoral diseases.

(57) Zusammenfassung: Ein Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung mindestens eines Cytokines und/oder Chemokines zur Herstellung eines topikal wirkenden Arzneimittels zur Behandlung von viralen und/oder mykotischen Hauterkrankungen und/oder Tumorerkrankungen.

---

**Topikale Verwendung von Cytokinen und Chemokinen zur Behandlung von viralen oder mykotischen Hauterkrankungen oder Tumorerkrankungen**

---

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die topikale Verwendung mindestens eines Cytokins und/oder Chemokins zur Behandlung von viralen und/oder mykotischen Hauterkrankungen und/oder Tumorerkrankungen sowie eine topikal wirkende Arzneimittelformulierung und ihre Herstellung.
- 10 Das Cytokin Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor (GM-CSF) wurde ursprünglich als Faktor isoliert, der das Wachstum von Makrophagen bzw. Granulozyten-enthaltenden Kolonien stimulierte. GM-CSF ist notwendig für das Wachstum und die Entwicklung von der Vorläuferzellen von Granulozyten und Makrophagen. Es stimuliert Myeloblasten und Monoblasten und initiiert die irreversible Differenzierung dieser Zellen. Es unterstützt Erythropoietin (EPO) bei
- 15 der Proliferation von Vorläuferzellen der Erythrozyten und Megakaryozyten. Ferner ist GM-CSF in der Lage, Neutrophile anzulocken. Es verstärkt antimikrobielle Aktivitäten, oxidativen Metabolismus und phagozytotische Aktivität von Neutrophilen und Makrophagen. Es verstärkt ebenso die Zytotoxizität dieser Zellen. Da
- 20 GM-CSF durch Zellen (T-Lymphozyten, Makrophagen im Gewebe, endotheliale Zellen, Mastzellen) produziert wird, die an Orten von entzündlichen Reaktionen präsent sind, ist davon auszugehen, dass GM-CSF ein wichtiger Mediator von entzündlichen Reaktionen ist.

- 2 -

Ebenso ist die Funktion der Langerhans-Zellen der Haut durch GM-CSF beeinflusst. Diese Zellen sind nicht in der Lage, eine primäre Immunreaktion auszulösen. Gemeinsam mit IL4 werden sie jedoch durch GM-CSF in hochwirksame immunstimulatorische dendritische Zellen umgewandelt.

5

GM-CSF wirkt synergistisch mit anderen Cytokinen, einschließlich den Interleukinen IL1, IL3, IL4 und Granulozyten-stimulierender Faktor (G-CSF).

10 Klinisch wird GM-CSF eingesetzt zur physiologischen Rekonstitution der Hämatopoese für alle Krankheiten die einhergehen mit einer unzureichenden Reifung von Blutzellen oder mit einer verringerten Produktion von Leukozyten. Die wohl bedeutendste klinische Anwendung findet GM-CSF bei der Behandlung der lebensbedrohlichen Neutropenie nach Chemo- und/oder Strahlentherapie. GM-CSF kann ebenfalls eingesetzt werden, um Chemotherapie-induzierte Cytopenien und  
15 Cytopenie-abhängige Prädispositionen für Infektionserkrankungen und Hämorrhagien zu behandeln. In solchen Fällen wird GM-CSF gewöhnlich in einer Dosierung von 5 bis 10 µg/kg/Tag entweder durch 4 bis 6-stündige intravenöse Infusion oder durch subkutane Injektion verabreicht.

20 Ferner wird GM-CSF bei zur Rekonstituierung des hämatopoetischen Systems nach autologen oder allogene Knochenmarkstransplantationen eingesetzt. Der therapeutische Effekt beruht hier nicht nur auf einer Verkürzung des Zeitraums einer absoluten Neutropenie, sondern ebenfalls auf signifikant weniger Infektionen, geringer intravenöser Antibiotika-Gabe und einer kürzen Hospitalisierung  
25 der Patienten.

Cytokine wie GM-CSF oder IL2, IL12, IL18, sowie die Interferone IFN $\gamma$  und IFN $\alpha$  werden derzeit in verschiedenen Indikationen auf den Gebieten von Tumo-

- 3 -

rerkrankungen eingesetzt bzw. getestet. So wird GM-CSF verschiedentlich zur Stimulation des Immunsystems in Kombination mit Antigenen verwendet, beispielsweise in Form einer GM-CSF-exprimierenden Tumorzelle oder in Form einer vorherigen oder gleichzeitigen Gabe von peptidischen Antigenen, z.B. von Tumorantigenen abgeleitet sind. Diesen Therapieformen liegt zugrunde, dass GM-CSF als eine Art Adjuvans für ein parallel verabreichtes Antigen fungiert (Lawson D, Kirkwood JM (2000) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: another cytokine with adjuvant therapeutic benefit in melanoma J Clin Oncol 18(8):1603-5).

10

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es folglich, weitere Anwendungen für Cytokine zu finden.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass die topikale Anwendung von Cytokinen und/oder Chemokinen, wie beispielsweise GM-CSF, dazu geeignet ist, virale und/oder mykotische Hauterkrankungen sowie Tumorerkrankungen zu behandeln.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit die Verwendung von mindestens einem Cytokin und/oder Chemokin zur Herstellung eines topikalen Arzneimittels zur Behandlung von viralen und/oder mykotischen Hauterkrankungen und/oder Tumorerkrankungen.

Aufgrund der beobachteten synergistischen Effekte zwischen unterschiedlichen Cytokinen und/oder Chemokinen ist es besonders vorteilhaft, wenn zwei, drei oder auch mehr als drei Cytokine und/oder Chemokine gleichzeitig oder zeitlich gestaffelt verarbeitet werden, wobei insbesondere drei, vor allem zwei Cytokine

- 4 -

und/oder Chemokine verwendet werden. Besonders bevorzugte Kombinationen sind GM-CSF, RANTES oder MIP1 $\alpha$  mit IL4, IL2, IL12; IFN $\gamma$  oder TNF $\alpha$ .

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält das Arzneimittel keine im  
5 wesentlichen antigen-wirkenden Bestandteile, wie zum Beispiel Tumorantigene oder virale Antigene. Als antigen-wirkende Bestandteile werden Antigene oder Teile davon verstanden, die im Patienten eine Immunantwort auslösen können. Unter dem Begriff "im wesentlichen keine antigen-wirkenden Bestandteile" versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung so wenig antigenwirkende Be-  
10 standteile, dass eine die Behandlung gefährdende Immunreaktion des Patienten im allgemeinen ausgeschlossen werden kann.

Der Begriff „Cytokin“ ist eine allgemeine Bezeichnung für eine große Gruppe löslicher Proteine und Peptide, die als humorale Regulatoren vorzugsweise in  
15 nano- bis picomolaren Konzentrationen fungieren. Diese modulieren unter normalen oder pathologischen Zuständen die funktionellen Aktivitäten von einzelnen Zellen oder Geweben. Ferner vermitteln sie direkt Interaktionen zwischen Zellen und regulieren Prozesse, die bevorzugt in der extrazellulären Umgebung ablaufen. „Chemokine“ sind eine Untergruppe der Cytokine. Es sind kleinere Proteine, die  
20 u.a. chemotaktisch auf Zellen wirken.

Unter den Begriff Cytokine fällt beispielsweise GM-CSF, G-CSF, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL21, IL22, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , Flt3 L, Flt3 sowie TNF $\alpha$ . Ein  
25 besonders bevorzugtes Cytokin ist GM-CSF. Unter den Begriff Chemokine fällt beispielsweise RANTES, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , MIP1 $\gamma$ , MIP1 $\delta$ , MIP2, MIP2 $\alpha$ , MIP2 $\beta$ , MIP3 $\alpha$ , MIP3 $\beta$ , MIP4, MIP5, MCP1, MCP1 $\beta$ , MCP2, MCP3, MCP4, MCP5, MCP6, 6cykine, Dck1 sowie DCDF. Besonders bevorzugte Chemokine sind GM-CSF, RANTES sowie MIP1 $\alpha$ . (Zu den Cytokinen und Chemokinen: Cytoki-

- 5 -

nes Online Pathfinder Encyclopedia, Horst Ibelgaufs' Hypertext Information Universe of Cytokines, Version 4.0, August 1999; Website: <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>). Ferner werden im Rahmen dieser Erfindung mutierte Varianten dieser Cytokine und Chemokine sowie Fusionsproteine dieser Cytokine und Chemokine verstanden. Diese umfassen beispielsweise Punktmutationen, Insertionen, Deletionen sowie Fusionen mit anderen Polypeptiden, beispielsweise mit sogenannten Tags, beispielsweise His-Tag, GST-Tag, Myc-Tag, GFP-Tag, oder Fusionen mit funktionellen Domänen anderer Polypeptide, beispielsweise mit Domänen von Immunglobulinen, anderen Cytokinen oder Chemokinen.

Unter topischer Anwendung wird das äußerliche Auftragen des Wirkstoffes auf die Haut verstanden. Vorzugsweise liegt der Wirkstoff in Form einer Salbe, eines Gels, eines Pflasters oder einer anderen hautverträglichen Formulierung vor. Vorzugsweise wird der Wirkstoff lokal in dem Bereich appliziert, in dem eine Hautveränderung und/oder -erkrankung vorliegt.

Unter viralen Hauterkrankungen werden Hauterkrankungen verstanden, die von Viren ausgelöst bzw. verursacht und/oder mit Virusinfektionen assoziiert sind. Hierzu zählen beispielsweise Hauterkrankungen wie zum Beispiel Hautwarzen, 20 genitale Warzen, anogenitale Warzen oder Schleimhautwarzen (siehe Tabelle 1), die von mindestens einem Papilloma Virus, insbesondere humanen Papilloma Virus, wie zum Beispiel HPV1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 46, 47, 48, 49, 50, 25 56 und 58 ausgelöst werden. Des weiteren zählen hierzu Erkrankungen, die durch mindestens ein Herpes Virus, insbesondere durch Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, Humanes Herpes Virus (HHV) 1, HHV2, HHV3, HHV4, HHV7, HHV8 sowie Varicella Zoster, also Lippenherpes, Kaposi-Sarcom, Windpocken und/oder Gürtelrose, ausgelöst werden.

**Tabelle 1**

<b><i>Tumor</i></b>	<b><i>Auslösende HPV-Typen</i></b>
<b>Hautviruswarzen</b>	
Verrucae plantares	1, 2, 4
Verrucae vulgares	2, 4
Verrucae plane juveniles	3, 10
Epidermodysplasia verruciformis	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-29, 36-38, 46-50
<b>Anogenitale Warzen</b>	
Condylomata acuminata	6, 11
Condylomata plana	6, 16, 31
bowenoide Papulose	16
<b>Schleimhautwarzen</b>	
Papillome an Larynx u. Mundschleimhaut	6, 11
fokale epitheliale Hyperplasie	13, 32

- Tumorerkrankungen, die mittels topikaler Application von beispielsweise GM-CSF behandelt werden können, sind Tumoren der Haut, beispielsweise Melanom oder
- 5 akute Keratinosis, Neoplasien des Genital- und Analtraktes, wie zum Beispiel Cervical Intraepithelial Neoplasien, Anal Intraepithelial Neoplasien oder Penile Intraepithelial Neoplasien (siehe auch Tabelle 2).

- 7 -

Tabelle 2

<i>Tumor</i>	<i>Auslösende HPV-Typen</i>
<b>Maligne Tumoren</b>	
Bowen-Krankheit	selten 2, 16, 34
Penis-, Anal- und Vulvakarzinom	6, 16, 18
<i>Tumor</i>	<i>Auslösende HPV-Typen</i>
Zervixkarzinom	16, 18
Larynxkarzinom	selten 16, 18, 30
Zungenkarzinom	selten 2, 16

Unter mykotischen Hauterkrankungen werden Hauterkrankungen verstanden, die durch Pilzinfektionen hervorgerufen werden. Diese umfassen Erkrankungen der Haut, der Hautanhangsgebilde wie auch der Schleimhäute einschließlich der äußeren und inneren Genitale. Hierunter werden vor allem Dermatomykosen (siehe Tabelle 3) sowie andere Mykosen, die mykotische Hauterkrankungen verursachen können, verstanden (siehe Tabelle 4 und Tabelle 5).



Tabelle 3

<i>Mykosen</i>	
<i>Wichtige Dermatomykosen</i>	
<i>Erreger</i>	<i>Erkrankung</i>
Candida albicans	Candidose der Haut u. Hautanhangsgebilde
Epidermophyton floccosum	Tinea (T.) manuum et pedum, T. corporis, T. inguinalis, T. unguium
Exophiala werneckii	Tinea nigra
Microsporum-Arten	Mikrosporie
<i>Erreger</i>	<i>Erkrankung</i>
Piedraia hortai	Schwarze Piedra
Malassezia furfur	Pityriasis versicolor
Scopulariopsis brevicaulis	T. unguium
Trichophyton mentagrophytes Trichophyton rubrum andere Trichophyton-Arten	Trichophytie, T. manuum et pedum, T. corporis, T. inguinalis, T. granulomatosa nodularis, T. unguium
Trichophyton schoenleinii	Favus
Trichophyton verrucosum	Tiefe Trichophytie, T. capitis, T. barae
Trichosporon cutaneum	Weißer Piedra

- 9 -

Tabelle 4

<b>Mykosen</b>		
<i>Wichtige kutane und subkutane (z. B. posttraumatisch entstandene) Mykosen</i>		
<b>Erreger</b>	<b>Erkrankung</b>	<b>Manifestation</b>
Cladosporium carrionii	Chromoblastomykose	Haut, Lymphsystem, Generalisation möglich
Phialophora compacta		
Phialophora dematitidis		
Phialophora pedrosoi		
Phialophora verrucosa		
Sporothrix schenckii	Sporothrix-Mykose	
<b>Erreger</b>	<b>Erkrankung</b>	<b>Manifestation</b>
Cephalosporium-Arten	Eumyzetom (Mycetoma pedis)	Haut, Lymphsystem, Skelettsystem
Madurella grisea		
Madurella mycetomi		
Petriellidium boydii		

Tabelle 5

<b>Mykosen</b>		
<i>Wichtige Erreger von Systemmykosen und ihre Manifestation</i>		
<b>Erreger</b>	<b>Erkrankung</b>	<b>Manifestation</b>
<b>Opportunistische Erreger</b>		
Aspergillus fumigatus	Aspergillus-Mykose Aspergillom	Atmungsorgane, Ohr, Generalisa- tion Ohr
Aspergillus niger u.a.		Ohr
<b>Erreger</b>	<b>Erkrankung</b>	<b>Manifestation</b>
<b>Opportunistische Erreger</b>		
Candida albicans	Candida-Mykose	Magen-Darm- Trakt, Atmungs- organe, ZNS, Generalisation
Candida glabrata		
Candida guilliermondii		
Candida krusei		
Candida parapsilosis		
Candida pseudotropicalis		
Candida stellatoidea		
Candida tropicalis		
Cryptococcus neoformans	Cryptococcus-Mykose	Atmungsorgane, ZNS, Generali-

- 11 -

		sation
Rhizopus oryzae	Mucor-Mykose	
<b>Primär pathogene dimorphe Pilze</b>		
Blastomyces dermatitidis	Blastomyces-Mykose	Atmungsorgane, Haut, Genitale, Generalisation
Coccidioides immitis	Coccidioides-Mykose	
Histoplasma capsulatum	Histoplasma-Mykose	Genitale, Lymphsystem, Generalisation
Paracoccidioides brasiliensis	Paracoccidioides-Mykose	

Das Arzneimittel wird gemäß der vorliegenden Erfindung im allgemeinen dadurch hergestellt, dass mindestens ein Cytokin und/oder Chemokin mit mindestens einem geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoff in Kontakt gebracht wird, beispielsweise durch vermischen oder auflösen. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch ein Verfahren zur Herstellung eines topikal wirkenden Arzneimittels bei dem mindestens ein Cytokin und/oder Chemokin mit mindestens einem Hilfsstoff, insbesondere mit humanem Serumalbumin, CpG oder oxidiertem Glutathion, in Kontakt gebracht wird. Das Cytokin und/oder Chemokin wird vorzugsweise gentechnisch, nach dem Fachmann bekannten Verfahren, hergestellt.

So kann beispielsweise ein entsprechendes Expressionskonstrukt für die gentechnische Herstellung des Cytokins und/oder Chemokins verwendet werden, enthaltend eine für das Cytokin und/oder Chemokin kodierende Nukleinsäure sowie einen geeigneten Promotor für die Expression in vorzugsweise Bakterien, z.B. *E. coli*, oder in eukaryotischen Zellen, wie zum Beispiel in Hefen, z.B. *S. cerevisiae* oder *S. pombe* oder *Pichia pastoris*, oder in höheren eukaryotischen Zellen, wie zum Beispiel in Insektenzellen oder humanen Zellen. Anschließend kann das

- 12 -

Cytokin und/oder Chemokin unter nativen oder nicht-nativen Bedingung nach dem Fachmann bekannten Methoden gereinigt werden.

Die Herstellung von Arzneimitteln mit einem Gehalt an mindestens einem Cytokin und/oder Chemokin bzw. deren Einsatz bei der erfindungsgemäßen Verwendung erfolgt in üblicher Weise anhand geläufiger pharmazeutisch-technologischer Verfahren. Dazu werden die Wirkstoffe bevorzugt zusammen mit geeigneten, pharmazeutisch annehmbaren Hilfs- und Trägerstoffen zu den für die verschiedenen Indikationen und Applikationsorte geeigneten Arzneiformen verarbeitet. Dabei können die Arzneimittel in der Weise hergestellt werden, dass die jeweils erwünschte Freisetzungsrate, z.B. eine rasche Anflutung und/oder ein Retard- bzw. Depoteffekt, erzielt wird.

Zur herkömmlichen Applikation auf der Haut oder Schleimhaut lassen sich zum Beispiel übliche Emulsionen, Gele, Salben, Cremes der mischphasigen bzw. amphiphilen Emulsionssysteme (Öl/Wasser-Wasser/Öl-Mischphase) sowie Liposomen und Transfersomen oder Pflaster, bevorzugt Salben und Cremes, besonders bevorzugt eine Salbe anführen. Vorzugsweise wird der Wirkstoff lokal in dem Bereich appliziert, in dem eine Haut- bzw. Schleimhautveränderung und/oder –

20

Als weitere topisch applizierbare Formen lassen sich auch Pasten, Puder oder Lösungen herstellen. Die Pasten enthalten als konsistenzgebende Grundlagen oft hydrophobe und hydrophile Hilfsstoffe, bevorzugt jedoch hydrophobe Hilfsstoffe mit sehr hohem Feststoffanteil. Die Puder oder topisch applizierbare Pulver können zur Erhöhung der Dispersität sowie des Fließ- und Gleitvermögens sowie zur Verhinderung von Agglomeraten, z.B. Stärkearten, wie Weizen- oder Reisstärke, flammendisperses Siliziumdioxid oder Kieselerden, die auch als Verdünnungsmittel dienen, enthalten.

25

Als topisch, lokal oder regional verabreichbare Arzneimittel kommen neben den bekannten Anwendungen auf der Haut und/oder Schleimhaut als spezielle Zubereitungen vorzugsweise die folgenden in Betracht: genital, vaginal oder rektal, insbesondere genital und vaginal applizierbare Emulsionen, Cremes, Salben, 5 Schaumtabletten oder Suppositorien. Auf der Grundlage von Gelatine oder anderen Trägerstoffen lassen sich auch Rektalkapseln bereitstellen. Als Suppositoriengrundlagen kommen z.B. Hartfette, wie z.B. Witepsol®, Massa Estarium®, Novata®, Kokosfett, Glycerin/Gelatine-Massen, Glycerin/Seifen-Gele und Polyethylenglykole in Betracht.

10

Die jeweils geeigneten Arzneiformen lassen sich in Einklang mit dem Fachmann bekannten Rezepturvorschriften und Verfahrensweisen auf der Basis pharmazeutisch-physikalischer Grundlagen herstellen.

15 Als Hilfs- bzw. Trägerstoffe eignen sich beispielsweise Natriumalginat als Gelbildner zur Herstellung einer geeigneten Grundlage oder Cellulosederivate, wie z.B. Guar- oder Xanthangummi, anorganische Gelbildner, wie z.B. Aluminiumhydroxide oder Bentonite (sog. thixotrope Gelbildner), Polyacrylsäurederivate, wie z.B. Carbopol®, Polyvinylpyrrolidon, mikrokristalline Cellulose oder Carboxymethylcellulose. Weiterhin kommen amphiphile nieder- und höhermolekulare 20 Verbindungen sowie Phospholipide in Betracht. Die Gele können entweder als Hydrogele auf Wasserbasis oder als hydrophobe Organogele, beispielsweise auf Basis von Gemischen nieder- und hochmolekularer Paraffinkohlenwasserstoffe und Vaseline vorliegen. Die hydrophilen Organogele können beispielsweise auf 25 Basis hochmolekularer Polyethylenglykole zubereitet werden. Diese gelartigen Formen sind abwaschbar. Unter den Organogelen sind die hydrophoben Organogele jedoch bevorzugt. Besonders bevorzugt sind hydrophobe Hilfsstoffe- und Zusatzstoffe wie Petrolatum, Wachs, Oleylalkohol, Propylenglykolmonostearat und Propylenglykolmonopalmitostearat. Des weiteren können Farbstoffe bei-

spielsweise gelbes und/oder rotes Eisenoxid und/oder Titandioxid zur farblichen Anpassung hinzugegeben werden.

Als Emulgatoren lassen sich beispielsweise anionische, kationische oder neutrale Tenside, beispielsweise Alkaliseifen, Metallseifen, Aminseifen, sulfurierte und sulfonierte Verbindungen, Invertseifen, hohe Fettalkohole, Partialfettsäureester des Sorbitants und Polyoxyethylensorbitans, z.B. Lanette-Typen, Wollwachs, Lanolin oder andere synthetische Produkte zur Herstellung der Öl/Wasser- und/oder Wasser/Öl-Emulsionen einsetzen. Geeignete Hilfsstoffe sind ferner beispielsweise inonisch oder anionische Detergentien, wie z.B. Triton-X-100, Tween, Natrium-desoxycholat, aber auch Polyole, wie z.B. Polyethylengrykol oder Glycerin, Zucker, z.B. Saccharose oder Glukose, Lipopolysaccharide, zwitterionische Verbindungen, wie z.B. Aminosäuren wie Glycin oder insbesondere Taurin oder Betain, oder Lipide.

Als Lipide in Form fett- und/oder öl- und/oder wachsartiger Komponenten zur Herstellung der Salben, Cremes oder Emulsionen können Vaseline, natürliche oder synthetische Wachse, Fettsäuren, Fettalkohole, Fettsäureester, z.B. als Mono-, Di- oder Triglyceride, Paraffinöl oder vegetabilische Öle, gehärtetes Rizinusöl oder Kokosöl, Schweinefett, synthetische Fette, z.B. auf Caprryl-, Caprin-, Laurin- und Stearinsäurebasis wie z.B. Softisan® oder Triglyceridgemische wie Miglyol® eingesetzt werden.

Zur Einstellung des pH-Wertes der Formulierung können beispielsweise geeigneten organischen oder anorganischen Puffer, osmotisch wirksame Säuren und Laugen, z.B. Salzsäure, Zitronensäure, Natronlauge, Kalilauge, Natriumhydrogencarbonat, ferner Puffersysteme, wie z.B. Citrat, Phosphat-Puffer, Tris-Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, HEPES-Puffer ([4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure), MOPS-Puffer (3-Morpholino-1-

- 15 -

propansulfonsäure) oder Triethanolamin verwendet werden. Die Auswahl des Puffers richtet sich im allgemeinen nach der gewünschten Puffermolarität.

5 Zur Erhöhung der Stabilität können ferner Konservierungsmittel, wie beispielsweise Methyl- oder Propylbenzoat (Parabene), Sorbinsäure, Proteine, z.B. bovines, humanes oder synthetisches Serumalbumin, und/oder Proteaseinhibitoren, wie z.B. Aprotinin,  $\epsilon$ -Aminocarbonsäure, Pepstatin A, EDTA oder EGTA, hinzugesetzt werden.

10 Hilfstoffe können ferner Penetrationsverstärker, beispielsweise hydrophobe Ester wie Isopropyllaureat, Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat, Isopropylstearat, Ethylmyristat, Propylmyristat, Butylmyristat und/oder Ethyloleat, insbesondere Isopropylmyristat sein. Unter dem Begriff „hydrophob“ wird dabei eine Verbindung verstanden, deren Löslichkeit in Wasser maximal ca. 0,2 mg/ml, insbesondere  
15 re maximal ca. 0,1 mg/ml beträgt.

Weitere geeignete Hilfsstoffe sind Adjuvantien, die die immunogene (sensibilisierende) Wirkung eines Antigens verstärken. Hierzu ist anzumerken, dass das Antigen, gegen das eine immunogene Wirkung erzielt werden soll, insbesondere ein  
20 virales, mykotisches und/oder Tumor-spezifisches Antigen ist, das in der Haut am Krankheitsherd exprimiert wird. Geeignete Adjuvantien sind insbesondere Adjuvantien, die eine Aktivierung der Toll-like-receptors bewirken, beispielsweise Adjuvantien wie CpG Oligonukleotide (Chen Y et al. (2001) Int. Immunol. 13, 1013-20), Lipopolysaccharide (Alexander C und Rietschel ET (2001) J. Endotoxin Res. 7, 3, 167-202), Bacillus Calmette-Guerin Zellwandgerüst (Matsumoto M et al (2001) Int. Immunopharmacol. 1, 8, 1559-69) sowie Superantigene (Osanto S et al (2001) Infect. Immun. 69, 11, 6633-42) und Agenzien, die die Signalwirkung von CTLA-4 inhibieren (WO 00/32231, WO 97/20574). Andere geeignete Adju-  
25



- 16 -

vantien sind z.B. Freundsches Adjuvans, Aluminium Hydroxid, oxidiertes Glutathion, doppelsträngige RNA oder Iscom.

Bevorzugt als Hilfsstoffe sind ferner Substanzen, die eine lokale Hautreizung bewirken, da dadurch die Wirkung von Cytokinen und/oder Chemokinen gesteigert wird. Hierzu zählt zum Beispiel DMSO.

Das Arzneimittel kann gemäß der vorliegenden Erfindung auch als Formulierung, enthaltend mindestens ein Cytokin und/oder Chemokin und eine Puffer- oder Salzlösung und/oder eine Salbengrundlage sowie gegebenenfalls mindestens einen geeigneten Zusatz- und /oder Hilfsstoff vorliegen.

Unter dem Begriff Formulierung versteht man eine Zusammensetzung in Form einer Lösung oder einer Suspension der genannten Cytokine und/oder Chemokine, wobei es sich dabei um eine im wesentlichen homogene Formulierung handelt, bei der auch bei längerer Lagerung bei ca. 4°C keine Sedimentation von Inhaltsstoffen beobachtet werden kann.

Besonders bevorzugt ist eine Formulierung, bei der das bzw. die enthaltene(n) Cytokin(e) und/oder Chemokin(e) nativ bzw. aktiv bleibt. Die Aktivität der Proteine ist für jedes einzelne Protein in einem entsprechenden Aktivitätstest nachweisbar.

Das Salz als beispielhafter Bestandteil einer Formulierung ist im allgemeinen ein Alkali- oder Erdalkalisalz, vorzugsweise ein Halogenid oder Phosphat, insbesondere ein Alkalihalogenid, vor allem NaCl und/oder KCl. Die Verwendung von NaCl ist besonders bevorzugt.

- 17 -

Bevorzugte Salbengrundlagen sind zum Beispiel Wasser-in-Öl-Salben, beispielsweise eine Wollwachsalkoholsalbe, bestehend aus Cetylstearylalkohol, Wollwachsalkohol und Vaseline oder Öl-in-Wasser-Salben (hydrophile Salben), beispielsweise bestehend aus emulgierendem Cetylstearylalkohol, Paraffinöl subli-

5 quidum und Vaseline.

Besonders bevorzugt ist die Anwendung einer zuvor beschriebenen Formulierung in Verbindung mit einem Mittel für eine Occlusion, d.h. dass die nach Auftragen der Formulierung auf die Haut, Schleimhaut und Hautanhangsorgane die behan-

10 delte Stelle abgedeckt wird. Dies kann beispielsweise durch eine Wundabdeckung in Form eines Pflasters oder Sprühverbands erfolgen.

Somit ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Behandlungskit enthaltend mindestens ein Cytokin und/oder Chemokin sowie ein Occlusionsmit-

15 tel.

Die Figuren und die folgenden Beispiele sollen die Erfindung und ferner bevorzugte Ausführungsformen und Merkmale der Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

20

### **Beschreibung der Figuren**

Fig. 1 zeigt die graphische Auswertung eines Hautpenetrationsexperiments von 3 GM-CSF-Formulierungen in einer Durchfluß-Diffusionszelle. Die Verteilung des aufgetragenen [ $^{125}$ I]-GM-CSF (in % der Gesamtaktivität) in der Rezeptorfüssig-

25 keit (Permeation), in der Haut und in den Salbenrückständen nach 36 h ist aufgetragen gegen die Formulierung.

- 18 -

Fig. 2 zeigt die graphische Auswertung eines Stabilitätsexperiments von den Formulierungen 43600 und 43400 im Vergleich zu GM-CSF zum Zeitpunkt 0 und nach Inkubation für 7 Tage bei 40°C, bei dem eine konstante Menge DMSO-Salbenextrakt mit ansteigenden Mengen an GM-CSF versetzt wurde (X-Achse, logarithmisch in % für Salbenextrakte enthaltend GM-CSF sowie in Units/ml für zugesetztes GM-CSF) und die Aktivierung von Monozyten an deren CD1a-Expression gemessen wurde (Y-Achse).

Fig. 3 zeigt die graphische Auswertung eines Stabilitätsexperiments der Formulierung 10101 zum Zeitpunkt 0 und nach Inkubation für 7 Tage bei 40°C, bei dem eine konstante Menge DMSO-Salbenextrakt mit ansteigenden Mengen an GM-CSF versetzt wurde (X-Achse, logarithmisch in %) und die Aktivierung von Monozyten an deren CD1a-Expression gemessen wurde (Y-Achse).

## Beispiel: 1 GM-CSF enthaltende Formulierungen

### 1. Beschreibung der Formulierungen

Es wurden folgende Formulierungsansätze mit je 100 µg/g humanem rekombinantem GM-CSF (Leucomax 400 von Sandoz AG, Basel, Schweiz) hergestellt:

Tabelle 6

Name	Typ	Inhaltsstoffe
43400	w/o	Wollwachsalkoholsalbe: - Cetylstearylalkohol (0,5%) - Wollwachsalkohol (6%) - Vaseline weiß (93,5%): 75% Leucomax 400 (=humanes GM-CSF) in 70% Glycerin 400 µg/g: 25%
43500	w/o DMSO	+ Wollwachsalkoholsalbe: - Cetylstearylalkohol (0,5%) - Wollwachsalkohol (6%) - Vaseline weiß (93,5%): 75% Leucomax 400 in DMSO 400 µg/g: 25%
43600	o/w	Hydrophile Salbe: - Emulgierender Cetylstearylalkohol (30%) - Paraffinöl subliquidum (35%) - Vaseline weiß (35%): 75% Leucomax 400 in 70% Glycerin 400 µg/g:25%  wurde alternativ auch mit 100, 50, oder 10 µg/g murinem GM-CSF gefertigt
10101	PEG	Polyethylenglykolsalbe - Polyethylenglykol 300 (100 g) - Polyethylenglykol 1500 (100 g)

w/o = Wasser in Öl; o/w = Öl in Wasser

#### Herstellung der Salben:

- 5 Alle Salben wurden unter aseptischen Bedingungen (Laminar flow, sterile Handschuhe, Mundschutz etc.) hergestellt.

20 g der Salbe mit der Bezeichnung 43400 wurden wie folgt hergestellt:

- 20 -

Zunächst wurde zur Herstellung der Wollwachsalkoholsalbe 1g Cetylstearylalkohol, 12 g Wollwachsalkohol sowie 187 g Vaseline weiß in ein Becherglas eingewogen und bei 70°C aufgeschmolzen und unter ständigem Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurde Leucomax 400 in 1 g Glycerinlösung 70% gelöst (5  
5 Gefäße a 400 µg/g = 2000 µg/5g). 15 g Wollwachsalkoholsalbe wurden in Reibschale vorgelegt, 5 g Leucomax / Glycerin-Lösung 400µg/g zugegeben und homogen eingerührt. Die Salbe wurde jeweils zu 1 g in Gefäße abgefüllt.

20 g der Salbe mit der Bezeichnung 43500 wurden wie folgt hergestellt:

10 Zunächst wurde zur Herstellung der Wollwachsalkoholsalbe 1g Cetylstearylalkohol, 12 g Wollwachsalkohol sowie 187 g Vaseline weiß in ein Becherglas eingewogen und bei 70°C aufgeschmolzen und unter ständigem Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurde Leucomax 400 in 1 g Dimethylsulfoxid reinst (DMSO) gelöst (5 Gefäße a 400 µg/g = 2000 µg/5g). 15 g Wollwachsalkoholsalbe  
15 wurde in Reibschale vorgelegt, 5 g Leucomax / DMSO-Lösung 400 µg/g zugegeben und homogen eingerührt. Die Salbe wurde jeweils zu 1 g in Gefäße abgefüllt.

20 g der Salbe mit der Bezeichnung 34600 wurden wie folgt hergestellt:

Zunächst wurden 70 g Vaseline weiß, 70 g Paraffinöl subl. und 60 g Emulgierder  
20 Cetylstearylalkohol in einem Becherglas eingewogen, bei 70°C aufgeschmolzen und anschließend bei ständigem Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurde Leucomax 400 in 1 g Glycerinlösung 70% gelöst (5 Gefäße a 400 µg/g = 2000 µg/5g). Von der hydrophilen Salbe wurden 15 g in eine Reibschale vorgelegt, die Leucomax / Glycerin Lösung 400 µg/g zugegeben und homogen eingerührt. Die  
25 Salbe wurde jeweils zu 1 g in Gefäße abgefüllt.

20 g der Salbe mit der Bezeichnung 10101 wurden wie folgt hergestellt:

Zunächst wurden 100 g Polyethylenglykol 300 und 100 g Polyethylenglykol 1500 bei 60 bis 70°C unter Rühren geschmolzen und bis zum Erkalten gerührt. Es wurde Leucomax 400 in 1 g Glycerinlösung 70% gelöst (5 Gefäße a 400 µg/g =  
5 2000 µg/5g). Von dem Polyethylenglykolgemisch wurden 15 g in eine Reibschale vorgelegt, die Leucomax / Glycerin Lösung 400 µg/g zugegeben und homogen eingerührt. Die Salbe wurde jeweils zu 1 g in Gefäße abgefüllt.

## 2. Herstellung <sup>125</sup>I-markiertes humanes GM-CSF-enthaltender Formulierungen

10

<sup>125</sup>I-markiertes humanes GM-CSF (NEN Life Sciences, Köln, Deutschland, <sup>125</sup>I-PACAP27, NEX294, Lot-Nummer GCB1500) wurde kalibriert. Die spezifische Aktivität betrug bei Beginn des Experiments 5,2 µCi (192,4 kBq). Das Protein wurde in lyophilisierter Form bezogen und in 70 µl aqua dest. aufgenommen (die  
15 Aufnahme in 35 µl führte nicht zu einer homogene Lösung). Die resultierende spezifische Aktivität der Lösung betrug 0,074 µCi/µl (2,75 kBq/µl).

Ca. 260 mg der drei verschiedenen GM-CSF-Formulierungen wurden in eine 48-Well Zellkulturschale transferiert. 15 µl <sup>125</sup>I-markiertes GM-CSF wurden zuge-  
20 geben und bei Raumtemperatur mittels eines Spatels mit der Formulierung vermischt. Zwischen 3 und 5 mg des Gemisches wurden in ein Szintillationsgefäß transferiert und 2 ml Packard Microscint-20 wurden hinzugegeben. Die Proben wurden für mehrere Minuten auf 60°C erhitzt und erneut gemischt. Anschließend wurden sie in einem Szintillationszähler gemessen (siehe Tabelle 7). Die ver-  
25 mischten Formulierungen wurden in Eppendorf Reaktionsgefäße transferiert und bei 4°C gelagert.

- 22 -

Als Kontrolle wurden 2 µl der  $^{125}\text{I}$ -GM-CSF Lösung (0,074 µCi/µl, 2,75 kBq/µl) unmittelbar in 2 ml Packard Microscint-20 gemessen.

Tabelle 7

Formulierung	Gewicht	zugegeben		gemessen		cpm/mg	% der theor. Akt.
		$^{125}\text{I}$ -GM-CSF/µl	Bq/mg	mg	cpm		
43400	263 mg	15	157	5	7,372	1,474	15,6
				4	6,415	1,603	17,0
43500	254 mg	15	162	4	5,778	1,444	14,8
				3	5,119	1,706	17,6
43600	280 mg	15	147	4	4,303	1,075	12,,2
				3	3,140	1,046	11,8
Kontrolle		2			76,890		23,0

5

Anhand der Kontrolle ist erkennbar, dass mittels dieser Methode lediglich 23 % der theoretisch zu erwartenden Aktivität messbar sind.

Diese Versuchsreihe macht deutlich, dass wässrig gelöstes GM-CSF (hier vorliegend als  $^{125}\text{I}$ -markiertes GM-CSF) in alle drei Formulierungen eingebracht werden konnte. Es gelingt,  $^{125}\text{I}$ -GM-CSF homogen in die beschriebenen Formulierungen einzubringen, was daran erkennbar ist, dass die Parallelanalysen der einzelnen Formulierungen lediglich geringe Abweichungen aufweisen. In den unterschiedlichen Formulierungen konnten zwischen 11,8 und 17,6 % der ursprünglich theoretisch zugegebenen Menge an GM-CSF nachgewiesen werden, wobei die systembedingt maximal nachweisbare Menge bei 23% liegt.

10

15

**Beispiel 2: Hautpenetration verschiedener GM-CSF Formulierungen**

Die Hautpenetration verschiedener GM-CSF Formulierungen wurde anhand eines *in vitro* Hautpenetrationsassays gemessen (siehe zum Beispiel: Bronaugh RL et al., (1982) Toxicol Appl Pharmacol 15;62(3): 481-488; Bronaugh RL, (2000) Ann N Y Acad Sci 919: 188-191).

Hautproben von weiblicher abdominaler Herkunft aus kosmetischen Operationen wurden verwendet. Hautscheiben (450 µm) wurde mittels eines Dermatoms präpariert, die das Stratum corneum, die Epidermis und Teil der Dermis enthielt. Es wurden Hautscheiben mit einem Durchmesser von 10 mm ausgestanzt und in einer Diffusionszelle eingesetzt. Die Hautstücke wurden zwischen Mikroskop-Objektträgern bei unter  $\leq -15^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Dicke der Hautscheiben wurde zwischen den Objektträgern-Aufhängungen gemessen. Da die Membranherstellung mit einer Beschädigung der Haut einhergehen könnte, wurde die Integrität der Hautmembran mikroskopisch überprüft, bevor diese in die Diffusionszellen eingepasst wurden.

Als Diffusionszelle wurde die Diffusionszelle von BSL BIOSERVICE, Planegg, Deutschland, verwendet. Diese ist mit einem PTFE-Donor und -Akzeptor für die Durchflusddiffusion für horizontale Exposition der Hautoberfläche ausgelegt. Die Fläche der Hautexposition beträgt  $19,63 \text{ mm}^2$ . Die Temperatur der Diffusionszellen wurden konstant gehalten. Eine Multikanal-Peristaltikpumpe wurde mit dem Rezeptorteil der Diffusionszelle verbunden und ein programmierbarer Fraktions-sammler wurde für die Sammlung der Proben eingesetzt.

Die gefrorene Haut wurde mit PBS gewaschen und auf den Akzeptorteil plaziert. Die Diffusionszelle wurde mit dem Rezeptorteil geschlossen und mit entgaster



- 24 -

Akzeptorflüssigkeit (Physiologischer Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (RT, pH 7,5 ± 0,3), ergänzt mit 0,1% BSA und 50 µg/ml Gentamycin; entgast) in horizontaler Position für mindestens 1 h equilibriert (Einstellung von Flussrate und Temperatur auf 0,6 ml/h und 32±1°C). Anschließend wurde eine definierte Menge  
5 der unter Beispiel 1.2 genannten <sup>125</sup>I-markierten GM-CSF-Formulierungen mittels Spatels auf die Hautoberfläche aufgebracht. Die Sammlung der Akzeptorflüssigkeit wurde für 36 gestartet, wobei alle 6 h das Auffanggefäß gewechselt wurde. Am Ende der Messreihe wurde die verbliebene Salbe von der Donorseite mit einem Wattestäbchen abgewischt. Nach dem Abbau der Diffusionszelle wurde die  
10 Hautmembran erneut mit einem Wattestäbchen abgewischt und die gesamten verbliebenen, nicht penetrierten Salbenreste wurde in einem Szintillationsgefäß gesammelt.

200 µl jeder gesammelten Fraktion wurden mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit  
15 (Microscint<sup>TM</sup>20, Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) vermischt. Die gesammelte, nicht penetrierten Salbenreste wurden mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt und in einem Ultraschall-Wasserbad bei 60°C für mindestens 30 min inkubiert. Die exponierten Hautscheiben wurden mit 500 µl Gewebeauflöser (Solvable<sup>TM</sup>, Packard) für mindestens 3 h bei 50°C inkubiert. Nach Abkühlung auf  
20 Raumtemperatur wurden 50 µl der aufgelösten Haut zu 4 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Die Radioaktivität all dieser Proben wurde in einem Szintillationszähler gemessen (in cpm) und die Verteilung des [<sup>125</sup>I]-GM-CSF in der Haut, ausgedrückt als Aktivität (nCi), in den nicht-penetrierten Salbenresten wie auch in der Akzeptorflüssigkeit nach der Formel

25

$$\text{Aktivität [nCi]} = \text{cpm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Quenchfaktor} / 60 / 37$$

bestimmt. P-Werte wurden nach dem unpaired t-test berechnet.

- 25 -

In dem beschriebenen Experiment konnte nachgewiesen werden, dass innerhalb von 36 h zwischen 1,4 und 3,7% des aufgetragenen [ $^{125}$ I]-GM-CSF durch die exponierten Hautschichten in die Akzeptorflüssigkeit durchdrangen. Dabei zeigte die Formulierung 43600 die niedrigste, 43400 hingegen die höchste Permeation.

5 Nach Versuchsabschluß wurden in der Haut 2,6% (43400), 2,2 % (43500) und 3,5% (45600) der aufgetragenen [ $^{125}$ I]-GM-CSF-Menge nachgewiesen. Geht man davon aus, dass sowohl das in der Haut als auch das durch die Haut hindurchgewanderte GM-CSF therapeutisch wirksam ist, so sind für die Formulierung 43400 >6%, für 43500 <5% und für 43600 <4% des aufgetragenen GM-CSF wirksam.

10

### Beispiel 3: Stabilität verschiedener GM-CSF Formulierungen

Um die Stabilität verschiedener GM-CSF Formulierungen zu testen, wurden ca. 10 mg der unter Beispiel 1.1 genannten Formulierungen steril eingewogen und für 7 Tage bei 40°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 5 µl DMSO/mg Creme versetzt, um das in der Creme enthaltene GM-CSF zu extrahieren. Die Proben wurden gründlich vermischt (Vortex) und ca. 2h bei RT inkubiert, wobei ca. alle 30 min nochmals per Vortex gemischt wurde. Die Proben wurden kurz

15

20 abzentrifugiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert.

Es wurden Monozyten nach bekannten Methoden isoliert (siehe z.B. Current Protocols in Immunology, Editors Coligan JE et al. 1999, Seiten 7.32.1-4). Diese wurden in Medium (RPMI - Gibco, Paisley, Schottland - mit 5%FCS) aufgenommen, so dass eine Konzentration von 175000-220000 Zellen pro 500 µl vorlag.

25

Humanes rekombinantes IL4 doppeltkonzentriert (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) hinzugeben (Endkonz. 500 Units/ml).

- 26 -

Die extrahierten Salbenproben wurden auf RT equilibriert, nach 30 min gründlich per Vortex gemischt und kurz abzentrifugiert.

- In je ein Well einer 48-well Platte wurden zunächst jeweils 1 ml Medium (RPMI mit 5%FCS) vorgelegt und anschließend 2,5 µl der Cremeextrakte oder – als Kontrolle – 0,5 µl humanes rekombinantes GM-CSF (entspricht 0,25 % Extrakt bzw. 500 Units GM-CSF) zugegeben. Von jedem dieser Ausgangsansätze wurden Verdünnungsreihen angesetzt, indem in Wells mit je 500 µl vorgelegtem Medium jeweils 500 µl des jeweils höher konzentrierten Ansatzes zupipettiert wurden.
- Diese Verdünnungsreihe sah somit wie in Tabelle 8 dargestellt aus.

Tabelle 8

	Extrakt / %	GM-CSF / Units
Ausgangsansatz:	0,25	500
1. Verdünnung:	0,125	125
2. Verdünnung:	0,06	60
3. Verdünnung:	0,03	30
4. Verdünnung:	0,015	15
5. Verdünnung:	0,0075	7,5
6. Verdünnung:	0,0037	3,75

- Anschließend wurden in jedes Well 500 µl der Monozyten-Suspension zugegeben. Die Platten wurde für 7 Tage bei 37°C inkubiert, die Zellen geerntet und mit Maus-anti-Human CD1a (1:50, Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) und anti-Maus IgG FITC (3/50, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt. Abschließend wurden die Zellen in einem FACS (FACS Calibur, Fa. Beckton Dickenson, Hamburg, Deutschland) hinsichtlich ihrer CD1a-Immunfärbung analysiert.

- 27 -

Als Positivkontrolle diente ein Ansatz aus 500 µl Medium mit 2,5 µl humanem rekombinanten GM-CSF, als Negativkontrolle ohne GM-CSF.

- 5 In den Stabilitätsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Formulierung 43600 nach 7 Tagen bei 40°C deutlich mehr GM-CSF Aktivität besitzt als die Formulierung 43400 (siehe Fig. 2). Auch die Formulierung 10101 besitzt nach der Inkubationszeit kaum noch GM-CSF Aktivität (siehe Fig. 3).

### Patentansprüche

- 5 1. Verwendung mindestens eines Cytokines und/oder Chemokines zur Herstellung eines topikal wirkenden Arzneimittels zur Behandlung von viralen und/oder mykotischen Hauterkrankungen und/oder Tumorerkrankungen.
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Arzneimittel mehr als drei, insbesondere drei, vorzugsweise zwei Cytokine und/oder Chemokine enthält.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das  
15 Arzneimittel im wesentlichen keine antigen-wirkenden Bestandteile enthält.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Cytokin und/oder Chemokin GM-CSF, G-CSF, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17,  
20 IL18, IL19, IL20, IL21, IL22, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , Flt3 L, Flt3, RANTES, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , MIP1 $\gamma$ , MIP1 $\delta$ , MIP2, MIP2 $\alpha$ , MIP2 $\beta$ , MIP3 $\alpha$ , MIP3 $\beta$ , MIP4, MIP5, MCP1, MCP1 $\beta$ , MCP2, MCP3, MCP4, MCP5, MCP6, 6cykine, Dcck1 und/oder DCDF, insbesondere GM-CSF, RANTES und/oder MIP1 $\alpha$  ist.
- 25 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die viralen Hauterkrankungen und/oder Tumorerkrankungen

- 29 -

hervorgerufen werden durch mindestens einen Papilloma Virus, insbesondere durch mindestens einen Humanen Papilloma Virus wie zum Beispiel HPV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 46, 47, 48, 49, 50, 56, 58, durch mindestens einen Herpes Virus, wie zum Beispiel Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, Varicella Zoster Virus oder Humanes Herpes Virus 1, 2, 3, 4, 7, 8.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die viralen Hauterkrankungen Warzen, Genitalwarzen, durch Papillomaviren verursachte benigne Tumore der Haut oder Schleimhaut, z.B. Verrucae plantares, Verrucae vulgares, Verrucae planae juveniles, Epidermodysplasia verruciformis, Condylomata acuminata, Condylomata plana, bowenoide Papulose, Papillome an Larynx oder Mundschleimhaut, fokale epitheliale Hyperplasie, Lippenherpes, Kaposi-Sarcom, Windpocken und/oder Gürtelrose sind.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumorerkrankungen Bowen-Krankheit, Penis-, Anal- und Vulvakarzinom, Zervixkarzinom, Larynxkarzinom und/oder Zungenkarzinom sind.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die mykotischen Hauterkrankungen Dermatomykosen, Chromoblastomykose, Sporothrix-Mykose, Eumyzetom oder Systemmykosen sind.

- 30 -

9. Verfahren zur Herstellung eines topikal wirkenden Arzneimittels, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Cytokin und/oder Chemokin mit mindestens einem Hilfsstoff, insbesondere mit humanem Serumalbumin, CpG oder oxidiertem Glutathion, in Kontakt gebracht wird.

5

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Cytokin und/oder Chemokin gentechnisch hergestellt wird.

- 10 11. Topikal wirkende Arzneimittelformulierung enthaltend mindestens ein Cytokin und/oder ein Chemokin sowie Cetylstearylalkohol, Vaseline und Wollwachsalkohol oder Parafinöl.

12. Behandlungskit enthaltend eine Formulierung gemäß Anspruch 11 sowie ein Occlusionsmittel.

15

13. Behandlungskit nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Occlusionsmittel ein Pflaster oder ein Sprühverband ist.

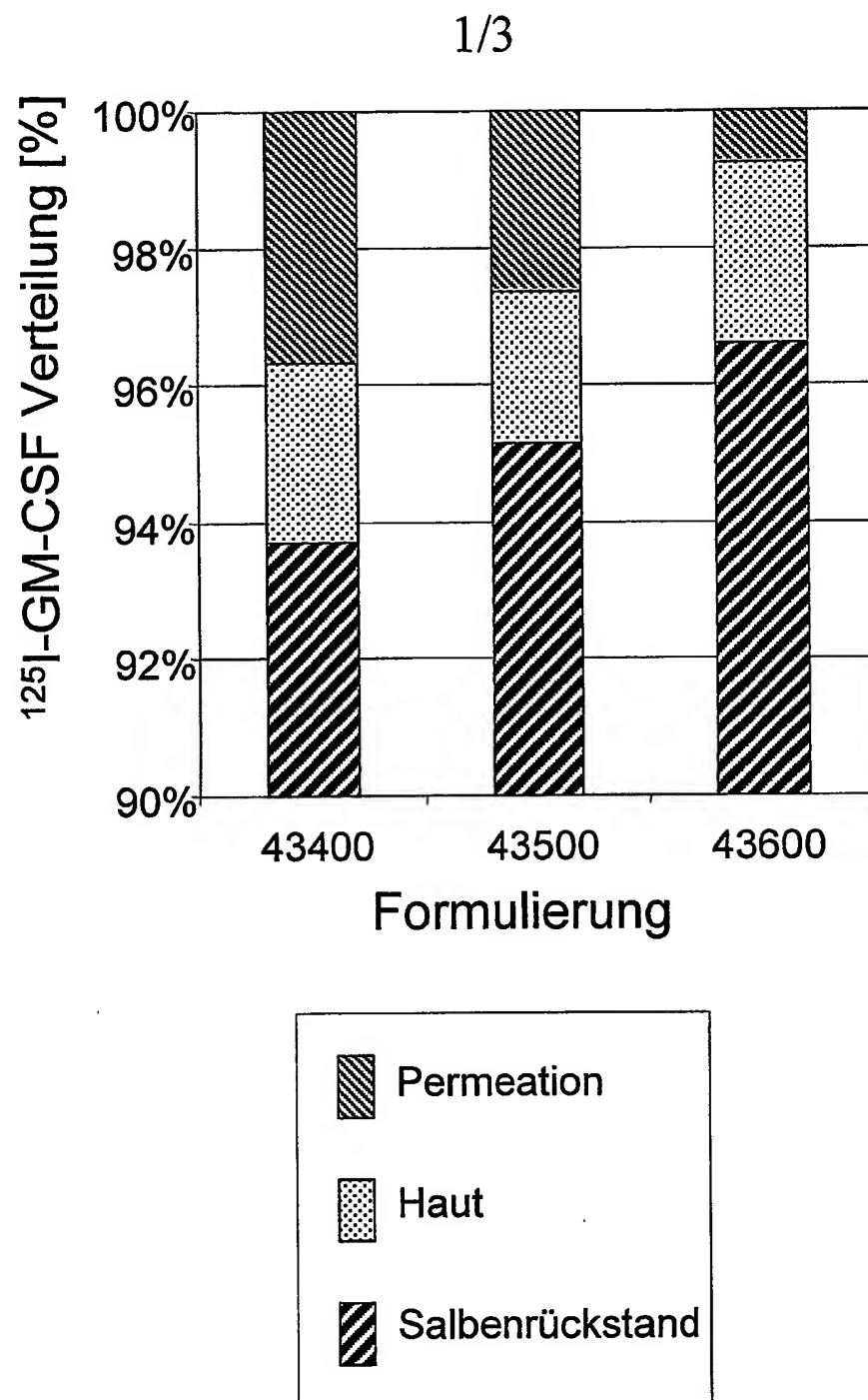


Fig. 1



2/3

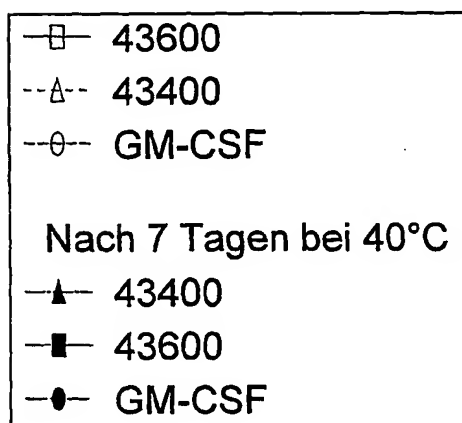
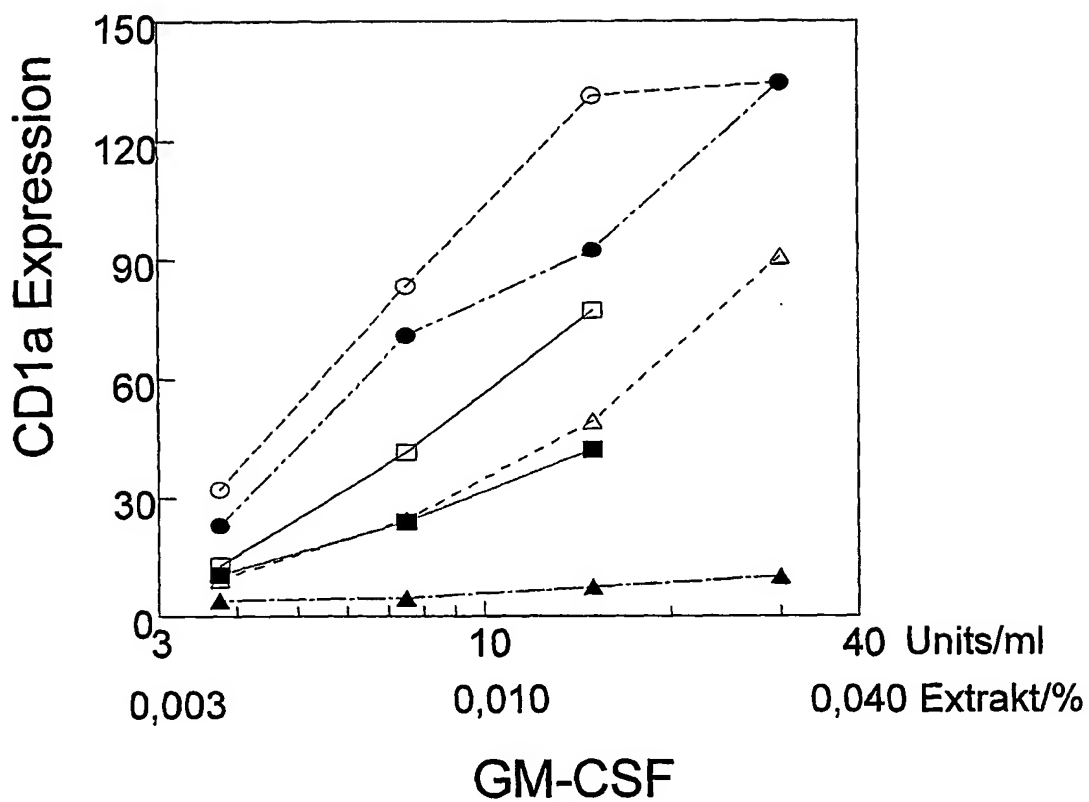


Fig. 2

3/3

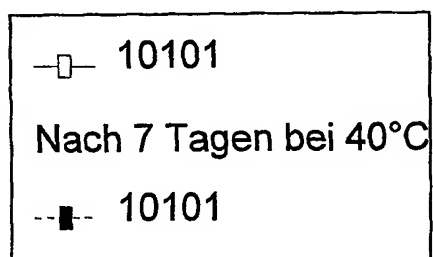
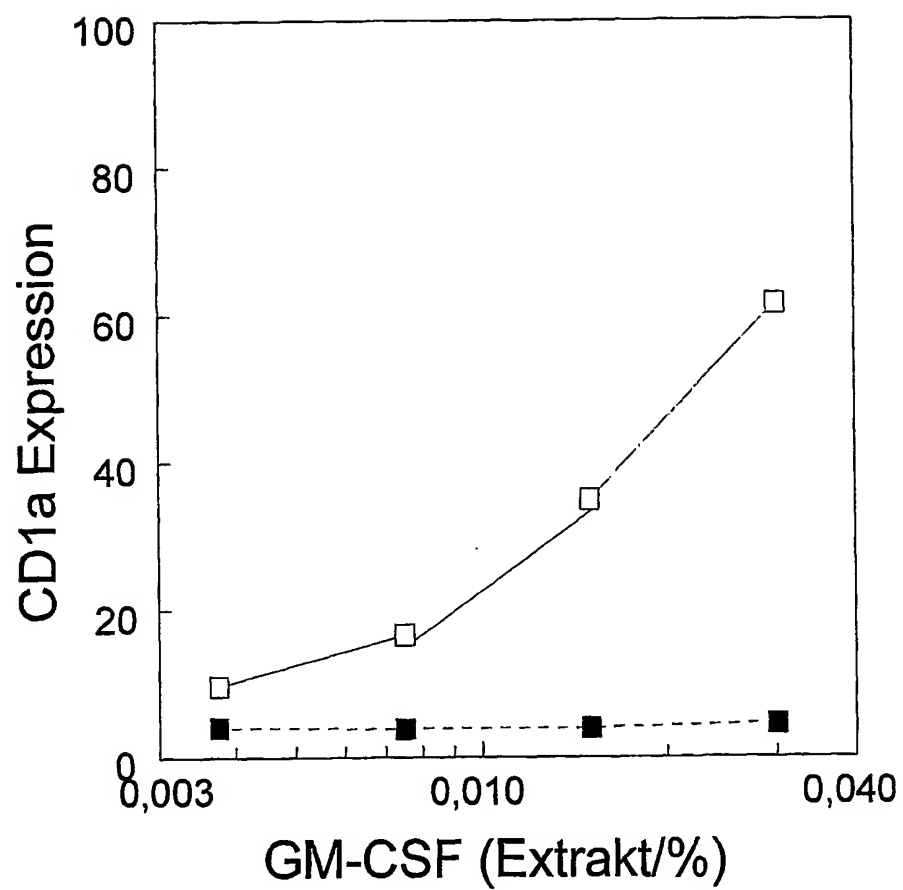


Fig. 3